

## 以 16S-23S rDNA spacer 核酸序列分析 台灣植物菌質體之親緣關係

徐仕美<sup>1</sup> 林長平<sup>1,2</sup>

1 臺北市 國立臺灣大學植物病理學系

2 聯絡作者：電子郵件 cplin@ccms.ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23661980

接受日期：中華民國91年10月25日

### 摘要

徐仕美、林長平. 2002. 以 16S-23S rDNA spacer 核酸序列分析台灣植物菌質體之親緣關係. 植病會刊 11:199-206.

本實驗以變異性較大的 16S-23S rDNA spacer 核酸序列來分析 6 種台灣、1 種大陸及 3 種國外植物菌質體之親緣關係，並進行分類。利用本實驗中所設計的兩引子對：G1/L1 和 rH3/rH3，以聚合酵素連鎖反應增幅 16S-23S rDNA spacer 區域，除了絲瓜簇葉病菌質體增幅出 3 條 spacer DNA 片段外，其餘植物菌質體均只增幅出 1 條 spacer DNA 片段。將增幅所得的 spacer DNA 片段進行核酸定序，結果發現在植物菌質體之 spacer 區域中有一 tRNA<sup>le</sup>，但絲瓜簇葉病菌質體的其中 2 條 spacer DNA，LWB-1 及 LWB-3 中並無 tRNA。比對排列後的植物菌質體 spacer 序列，發現只有 tRNA 區域及兩段有關 rRNA processing 的片段較具保守性。從 spacer 序列推衍的親緣演化樹顯示這 10 種植物菌質體可分為 5 群：第一群，甘藷簇葉病、甘藷簇葉病(大陸品系)、花生簇葉病及細花野牽牛簇葉病等菌質體；第二群，絲瓜簇葉病菌質體；第三群，榆樹黃化病菌質體；第四群，水稻黃萎病及甘蔗白葉病菌質體；第五群，翠菊黃化病(紐澤西及西岸品系)菌質體。

關鍵詞：親緣關係、植物菌質體

### 緒言

植物菌質體 (phytoplasma) 原稱為似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)<sup>(5)</sup>，為一重要植物病原菌，可引起至少 300 多種植物病害<sup>(25)</sup>。由於植物菌質體至今仍無法在實驗室中進行人工培養，因此欲藉其生長形態與生化上的特性做為分類依據實屬困難。

直到 1985 年，針對翠菊黃化病菌質體 (aster yellows phytoplasma) 之單元抗體首先被研發出來，提供了植物菌質體鑑定與分類上一個有效的工具<sup>(23)</sup>。隨後核酸探針也成功的被開發，並應用於植物菌質體的診斷與分類上<sup>(4,16,18,21,24)</sup>。具高度專一性的單元抗體和核酸探針為診斷植物菌質體相當有效的工具，然而若應用在分類上則有其限制。單元抗體與核酸探針通常只能用在親緣關係較近的植物菌質體，大多數單元抗體與核酸探針不適用於探討關係較遠的植物菌質體間，或是植物菌質體與其他原核生物的關係。

由於分子技術的發展成熟，以及分子資料的取得容易，因此分子演化學成為一新興學門。而且由分子資料推衍的生物分類結果，往往能與物種演化過程中之親緣關係

相吻合。再者，就演化學之觀點而言，能符合親緣關係的分類架構是較佳的物種分類系統。若能找到適當的分子標的，應用在植物菌質體親緣關係的分析，如此就能突破無法人工培養而缺乏型態與生化資料的限制，建立植物菌質體的親緣分類系統。

由於核糖 RNA (rRNA) 在所有生物中具有功能上與演化上之同源性 (homology)，再者，rRNA 是古老的分子，其整體結構與核酸序列在物種間非常保守 (conserved)；而且 rRNA 能提供足夠的序列資料用在數值分析方法上；再加上 rRNA operon 中有保守性區域及變異性區域，更可應用於不同層次分類上的探討；最後，因為 rRNA 在細胞中含量很高，容易取得<sup>(1,29)</sup>，所以本實驗選擇 rRNA 基因 (也稱為 *rrn* operon，或 rDNA) 做為分析親緣關係的分子。

本研究中利用兩對引子以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 來增幅植物菌質體 16S-23S spacer rDNA，嘗試以該 DNA 片段的核酸序列分析結果，針對 6 種台灣的植物菌質體：甘藷簇葉病 (sweetpotato witches' broom, SPWB)、花生簇葉病 (peanut witches' broom, PNWB)、細花野牽牛簇葉病 (*Ipomoea obscura*

witches' broom, IOWB)、絲瓜簇葉病 (loofah witches' broom, LWB)、水稻黃萎病 (rice yellow dwarf, RYD) 及甘蔗白葉病 (sugarcane white leaf, SWL)；1 種大陸植物菌質體：甘藷簇葉病大陸品系 (mainland China strain of sweetpotato witches' broom, SPWBM)；與 3 種外國植物菌質體：榆樹黃化病 (elm yellows, EY)、翠菊黃化病紐澤西品系 (New Jersey strain of aster yellows, AYNJ)、翠菊黃化病西方品系 (western strain of aster yellows, AYW) 進行親緣關係的探討，並期望能提供將來植物菌質體分類的重要參考依據。

## 材料與方法

### 植物菌質體來源

本實驗以 10 種植物菌質體做為材料，其 DNA 從溫室試驗植物日日春 (*periwinkle*, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don) 或天然寄主植物中純化獲得，植物菌質體的簡稱、全名及來源列於表一。

溫室中以日日春做為試驗植物來繁殖植物菌質體。利用頂接法或旁接法，將病株小枝條嫁接於健康日日春枝條上，藉此將植物菌質體傳播到另一株日日春中。待新生枝條出現病徵，則可確定嫁接成功，這些植株可做為抽取植物菌質體 DNA 的材料來源。

表一、本實驗中所使用的植物菌質體的簡稱、全名及來源  
Table 1. Designation, origin and source of the phytoplasma isolates<sup>1</sup>

Designation for Phytoplasma Diseases	Origin	Source <sup>2</sup>
AYNJ	Aster yellows (New Jersey strain)	1
AYW	Aster yellows (Western strain)	1
EY	Elm yellows	1
IOWB	<i>Ipomoea obscura</i> witches' broom	2
LWB	Loofah witches' broom	2
PNWB	Peanut witches' broom	2
RYD	Rice yellow dwarf	3
SPWB	Sweetpotato witches' broom	2
SPWBM	Mainland China strain of sweetpotato witches' broom	1
SWL	Sugarcane white leaf	4

<sup>1</sup> The RYD and SWL phytoplasmas were obtained from their natural host plants, rice and sugarcane, respectively; the others were from periwinkle.

<sup>2</sup> Collected and/or transmitted to periwinkle, or scions originally provided by: 1. T. A. Chen, Rutgers University, New Jersey, USA; 2. I. L. Yang, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufang, Taiwan; 3. C. C. Chen and W. H. Ko, Taichung District Agricultural Improvement Station, Changhua, Taiwan; 4. C. T. Chen, Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, Taiwan.

水稻黃萎病與甘蔗白葉病菌質體的 DNA 直接自天然寄主植株抽取。水稻黃萎病的水稻病株由行政院農委會台中區農業改良場陳慶忠博士及柯文華先生提供。甘蔗白葉病的甘蔗病株則由台灣糖業研究所陳主得博士提供。

### 植物全 DNA 抽取

健康及受植物菌質體感染的罹病植物全 DNA (total DNA) 抽取，主要利用核酸抽取緩衝液 (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)<sup>(6)</sup>，並根據 Ahrens 及 Seemuller 的方法<sup>(2)</sup>，稍作修改後進行<sup>(1)</sup>。抽取得到的 DNA 經定量後，以 TE 緩衝溶液 (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) 稀釋成濃度為 50 ng/μl 的 DNA 溶液，保存於 -20°C，做為 PCR 中的模板 DNA (template DNA)。

### 引子設計

本實驗中用來增幅植物菌質體 16S-23S rDNA spacer 區域的引子對：G1/L1 和 fH3/rH3 (圖一)，其序列及位置如表二所示。L1 源自 Jensen 等人所設計為增幅原核 16S-23S spacer 區域的廣效型引子對 (universal primer pair) G1/L1<sup>(14)</sup>；而 G1' 是為增幅植物菌質體，將 G1 向 3' 端移了 1 個鹼基而來。

fH3/rH3 則是本研究所開發之引子對。fH3 是比較了 23 種 16S RNA 基因之 3' 端序列後設計出來的引子，這些 16S RNA 基因的來源如下：13 種植物菌質體 (GenBank accession no. 標示於括號中)：American aster yellows (X68373)<sup>(35)</sup>、Apple proliferation (X68375)<sup>(35)</sup>、Apricot chlorotic leafroll (X68338)、Ash yellows (X68339)<sup>(35)</sup>、Coconut lethal yellowing (X80117)、Elm yellows (X68376)<sup>(35)</sup>、Flavescence doree (X76560)<sup>(35)</sup>、European stone fruit yellows of Peach (X68374)<sup>(35)</sup>、Group I MLO (D12569)<sup>(27)</sup>、Group II MLO (D12580)<sup>(27)</sup>、Group III MLO (D12581)<sup>(27)</sup>、*Oenothera* MLO (M30790)<sup>(22)</sup>、Western aster yellows

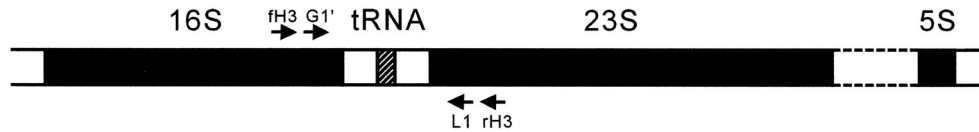
表二、聚合酶連鎖反應中用來增幅植物菌質體 16S-23S spacer 的引子

Table 2. Primers used for PCR amplification of 16S-23S spacer of phytoplasmas

Primer	Sequence (5' to 3')	Position	Length (mer)
G1'	AAGTCGTAACAAGGT	1485-1499 <sup>1</sup>	15
L1	CAAGGCATCCACCGT	74-60 <sup>2</sup>	15
fH3	CTAAGGTAGGGTCCGA	1459-1473 <sup>1</sup>	15
rH3	GTTTCGCCGTTAATT	5-21 <sup>2</sup>	15

<sup>1</sup> The numbers of positions are the numbers in the 16S rRNA sequence of the strain OAY phytoplasma (22).

<sup>2</sup> The start site in the 23S rRNA sequence of the strain SAY phytoplasma is designed as nucleotide number 1 (20).



圖一、原核細菌核糖 RNA operon 之組成及本研究中所使用之聚合酵素連鎖反應引子之位置。

**Fig. 1.** Schematic representation of a procaryotic rRNA operon showing the approximate priming sites of the primers used in the study for PCR amplification of the 16S-23S spacer region. The number of tRNA genes in the spacer region is subjected to variations.

(M86340)<sup>(20)</sup>；2 種 Mollicutes：*Acholeplasma seiffertii* (L12056)<sup>(28)</sup>、*Mycoplasma capricolum* (X00922)<sup>(13)</sup>；4 種革蘭氏陽性細菌：*Bacillus subtilis* (K00637)<sup>(8)</sup>、*Clostridium perfringens* (M59103)、*Clostridium piliforme* (L07416)<sup>(7)</sup>、*Clostridium tyrobutyricum* (L08062) (directly submitted data)，1 種革蘭氏陰性細菌 *Agrobacterium tumefaciens* (D14506)<sup>(32)</sup>；以及 3 種植物葉綠體：大豆葉綠體 (X06428)<sup>(39)</sup>、菸草葉綠體 (V00165)<sup>(38)</sup>、水稻葉綠體 (X15901)<sup>(11)</sup>。rH3 是比較了 5 種 23S RNA 基因之 5' 端序列後所設計的引子，參考來源如下：1 種植物菌質體 Western aster yellows (M86340)<sup>(20)</sup>；1 種 Mollicutes: *Mycoplasma capricolum* (X00922)<sup>(13)</sup>；2 種革蘭氏陽性細菌：*Bacillus subtilis* (K00637)<sup>(8)</sup>、*Clostridium tyrobutyricum* (L08062) (directly submitted data)；與 1 種革蘭氏陰性細菌 *Escherichia coli* (V00348)<sup>(3)</sup>。

### 聚合酵素連鎖反應

以 PCR 增幅植物菌質體 DNA 乃依照 Saiki 等人<sup>(30)</sup> 之方法修改而來：取 100 ng 的罹病或健康植物全 DNA 模板進行總體積為 50  $\mu$ l 的 PCR 反應，另外加入 5  $\mu$ l *Taq* DNA polymerase 10X buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 25°C, 1% Triton X-100)、100  $\mu$ M dNTPs (Pro Tech, Taipei, ROC)、各 0.5  $\mu$ M 的引子、1 unit 的 *Taq* DNA polymerase (Promega Cooperation, Madison, WI)，以及 2 滴加熱溶化的 Dyna Wax (Finnzymes Oy, Espoo, Finland)。放入已預熱至 95°C 的 PCR 反應器 (Thermal Cycler 480, Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, CT) 中進行 60 次循環 (cycle) 的 PCR，反應條件如下：變性反應 (denaturation) 94°C，5 秒鐘，黏合反應 (annealing) 45°C，5 秒鐘，延伸反應 (extension) 72°C，10 秒鐘，最後一次循環則將延伸反應時間多加 3 分鐘。

PCR 完成後，取 5  $\mu$ l 產物以 0.5X TBE 緩衝液 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 配製之 1.5% (w/v) 瓊脂凝膠進行水平式電泳，藉此觀察 PCR 產物。

### 核酸定序與親緣關係之分析

PCR 產物經電泳分析若只有一個條帶，直接以 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega

Cooperation, Madison, WI) 從事純化。若 PCR 產物不只一種或有非專一產物，則須先經電泳分離 (條件同上)，把所要產物位置的凝膠切下，再用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 進行進一步純化。純化所得的 PCR 產物即可做為核酸定序的模板。

增幅出的植物菌質體 16S-23S spacers 依據 chain-termination 原理<sup>(31)</sup>，利用 *Taq* DNA 聚合酵素進行反應<sup>(12)</sup>，以決定該區域的核酸序列，定序反應中所使用的引子同前 PCR 中的引子。詳細定序反應的步驟參照 *fmol* thermo-cycle sequencing kit (Promega) 之建議操作，反應的結果產物以 6% 聚丙醯胺 (polyacrylamide) 膠體進行電泳。

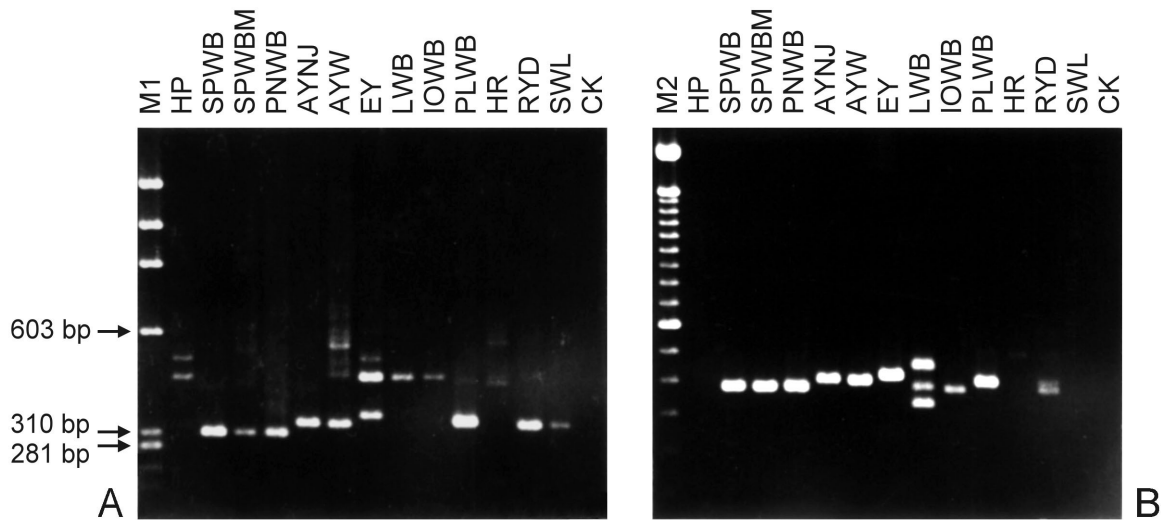
定序獲得的 16S-23S rDNA spacers 核酸序列經 CLUSTAL<sup>(10)</sup> 及人為排列後，輸入電腦。用 PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony 3.1.1)<sup>(37)</sup> 軟體進行分析這 10 種植物菌質體的親緣關係，分析中選擇以 AYNJ、AYW 與西方翠菊黃化病菌質體 (Western aster yellows，簡稱為 SAY) 為外群 (out group)，利用 ACCTRAN (accelerated transformation) 縮短演化樹的長度，經啟發式方法 (heuristic method) 搜尋最短樹長之演化樹。

## 結果

### 植物菌質體 16S-23S rDNA spacer 區域之增幅

利用 G1'/L1 引子對增幅植物菌質體 16S-23S spacer 區域的 PCR 結果 (圖二 A)，不論是健康或是罹病植物，所有的 DNA 樣品均有產物。健康植物的主要產物大小約 500 bp，植物菌質體的主要產物大小在 300-400 bp 之間，所有樣品均有非專一性產物出現，有些植物菌質體甚至沒有主要產物 (如 LWB 與 IOWB 只具非專一產物)。利用 fH3/rH3 引子對的增幅結果 (圖二 B)，健康植物 DNA 樣品並沒有出現產物，植物菌質體的產物 (若有產物) 大小介於 300-500 bp 之間，SWL 沒有產物出現，RYD 的產物量相對較少，其他植物菌質體經過電泳分析都出現一條主要產物條帶。值得注意的是，LWB 出現 3 條 DNA 條帶。

衡量 16S-23S spacer 區域的 PCR 結果，本研究選擇 G1'/L1 引子對增幅的 RYD 與 SWL 產物，fH3/rH3 引子對增幅的 SPWB、SPWBM、PNWB、IOWB、EY、LWB、



圖二、利用G1'/L1 引子對(A) 以及fH3/rH3 引子對(B) 以PCR 增幅植物菌質體 16S-23S spacer DNA 之產物電泳結果。  
**Fig. 2.** PCR amplification of the 16S-23S spacer using G1'/L1 (A) and fH3/rH3 (B) from 11 phytoplasmas described in the Table 1. PLWB, Paulownia witches' broom (prepared in this lab). Lane M1,  $\phi$ x174 RF DNA digested with *Hae*III, fragment size in base pairs from top to bottom: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271; lane M2, 100bp DNA ladder showing the smallest fragment of 300 bp and the larger ones with 100 bp increment each to indicate the products in the sizes between 300 and 500 bp; lane HP, healthy periwinkle; lane HR, healthy rice.

AYNJ 與 AYW 產物，經純化後做為核酸定序的模板。LWB 的 PCR 有 3 主要產物，純化後，依其片段大小由大至小分別稱為 LWB-1、LWB-2 及 LWB-3。

### 植物菌質體 16S-23S rDNA spacer 區域之核酸定序

核酸定序中使用的引子，與用來增幅 16S-23S spacer 區域的引子相同。SPWB、SPWBM、PNWB、IOWB、EY、LWB-1、LWB-2、LWB-3、AYNJ 與 AYW 之核酸分別使用 fH3 及 rH3 引子定序 spacer 的兩股 DNA，而 RYD 及 SWL 則使用 G1' 及 L1 引子定序。本研究獲得核酸序列(包含 16S rDNA 3' 端、16S-23S spacer 區域及 23S rDNA 5' 端)，加上 SAY 的 16S-23S spacer 核酸序列<sup>(20)</sup>，排列後的結果列於圖三。除 LWB1 與 LWB3 外，其它 spacer 中均具有 1 個 tRNA<sup>ile</sup> 序列。

### 親緣關係之推衍

利用 PAUP 軟體分析核酸序列，將 gap 列入計算，以 AYNJ、AYW 與 SAY 為外群，經啟發式方法搜尋到 3 株最短樹長為 610 之演化樹，由此 3 株演化樹合併可得嚴格共同樹(圖四)。根據共同樹的樹形中親緣關係由近至遠，可將植物菌質體分為五群：第一群，SPWB、SPWBM、PNWB 及 IOWB；第二群，LWB；第三群，EY；第四群，RYD 及 SWL；第五群，AYW、AYNJ 及 SAY。

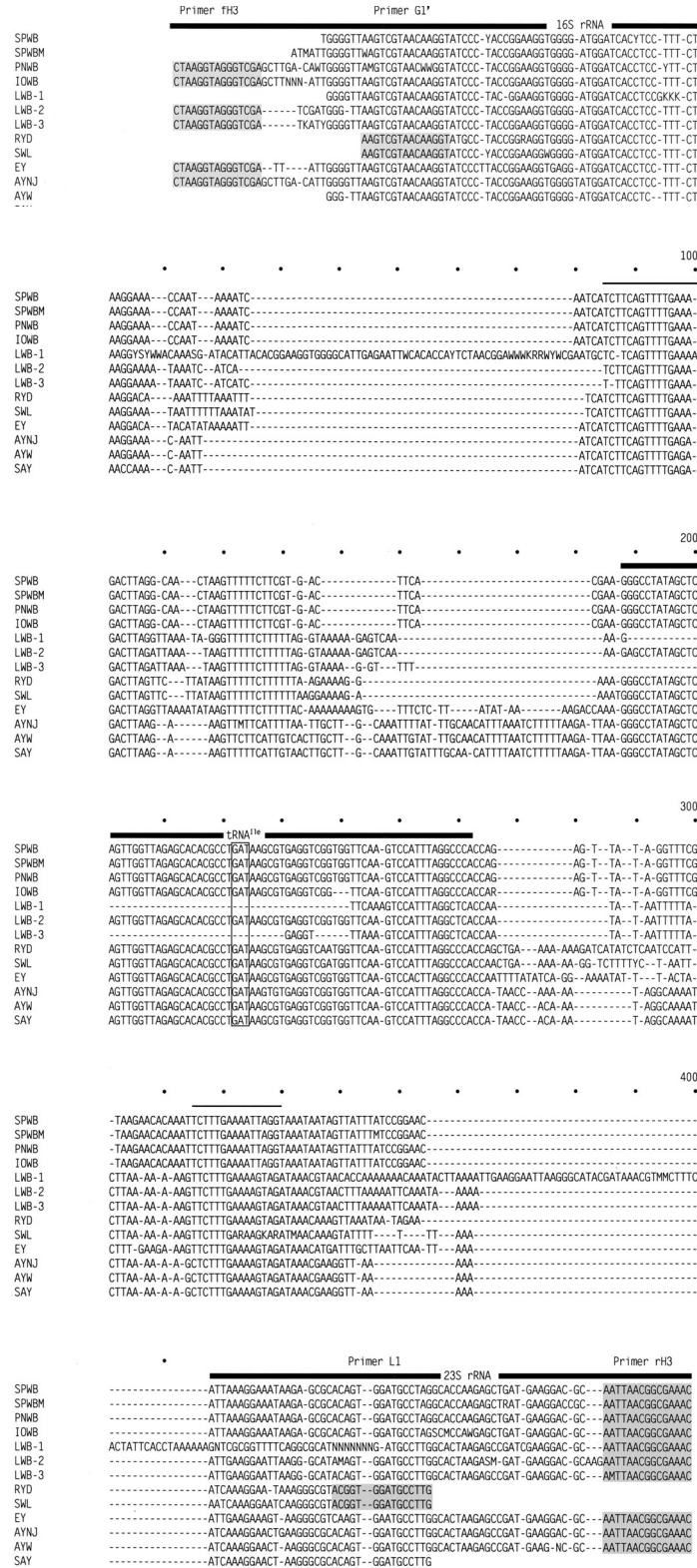
### 討 論

原核生物含有 1-15 個核糖 RNA 基因，一般而言，每個核糖 RNA 基因包含 3 種 rRNA，從 5' 端到 3' 端依序為 16S-23S-5S，每段 coding region 間以 transcribed spacer 隔開，rRNA 基因的前後也有 transcribed spacer，16S 和 23S 間有時會有 1 到 2 個 tRNA(圖一)。這些 16S、23S、5S 和 tRNA 區域為序列較保守的區域，spacer 區域則是變異較大之區域。因此核糖 RNA 基因可用在不同層次的親緣關係分析，例如 16S 等較保守區域可應用於差異較大的物種，而變異較大的 spacer 可用於較相近的物種。

本實驗利用 PCR 技術，並配合針對植物菌質體 16S-23S spacer 區域設計的引子：G1'、fH3 與 rH3，以及其他學者針對原核 16S-23S spacer 區域所設計的 L1 引子<sup>(14)</sup>，可從少量的罹病植物全 DNA 中增幅出植物菌質體 16S-23S rDNA spacers，並不受到實驗材料中植物菌質體無法培養的限制。

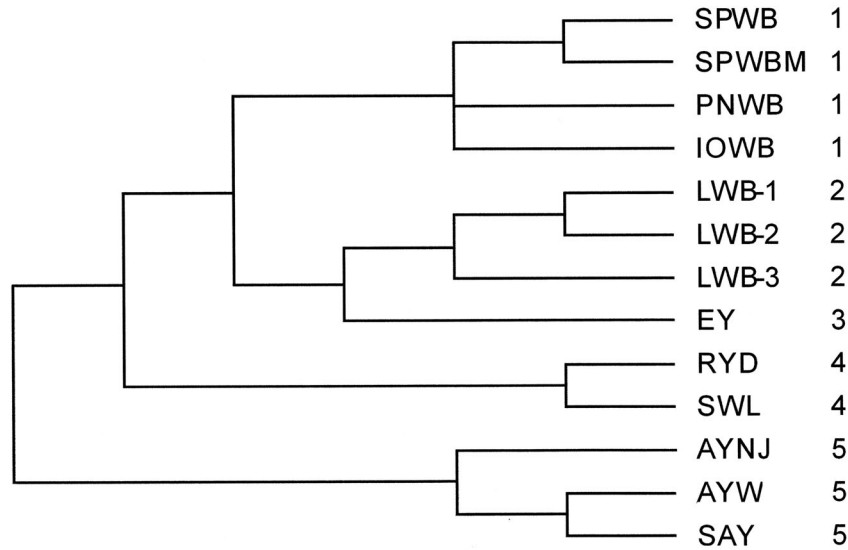
在增幅植物菌質體 16S-23S spacer DNA 時所用的引子對，G1' 和 L1，分別與葉綠體的 16S rRNA 及 23S rRNA 有可互相對應之區域，因此 PCR 也會從健康植物全 DNA 中增幅出產物(圖二 A)。本實驗設計的引子對，fH3 與 rH3，從健康植物全 DNA 並不會增幅出產物，但 fH3 與 rH3 也無法增幅出 RYD 和 SWL 之 16S-23S spacer DNA(圖二 B)，此對引子或許可應用在某些植物菌質體的偵測上。

利用 fH3 與 rH3 可從 LWB 罹病植物全 DNA 增幅出 3



圖三、植物菌質體 16S-23S spacer 序列之排列。

**Fig. 3.** Phytoplasma 16S-23S spacer sequence alignment. Coding regions are indicated with heavy lines. Primer sequences used to amplify spacers are shaded, and these sequences do not necessarily represent original sequences of phytoplasmas. Sequences in the tRNA<sup>Ile</sup> that correspond to anticodons are shown in the box. The highly conserved sequences implicated in rRNA processing are indicated with single lines above. Gaps are represented by "-". The ambiguous bases are abbreviated as recommended by the International Union of Biochemistry: R, A or G; Y, C or T; M, A or C; K, G or T; S, G or C; W, A or T; H, A or C or T; B, C or G or T; V, A or C or G; D, A or G or T; N, A or C or G or T. Sequence of SAY, from Kuske and Kirkpatrick, 1992.



圖四、根據16S-23S spacer 序列推衍植物菌質體親緣關係之嚴格公分樹。右方顯示的數字代表分群。

**Fig. 5.** Phylogenetic relationships of 11 phytoplasmas inferred by 16S-23S spacer sequence. The tree depicted represents the strict consensus tree of 3 equiparsimonious trees by use of a heuristic search in PAUP. Tree length = 610; consistency index = 0.854; retention index = 0.845. The numbers indicated on the right stand for the group numbers.

條DNA 片段，顯示LWB 可能有3個rRNA operons，由植物菌質體核酸序列結果確定，這3條DNA 片段並非因為模板DNA 污染所造成。且符合他人與本實驗室的先前研究結果，指出植物菌質體有二個或二個以上的rRNA operons<sup>(1,33)</sup>。

植物菌質體16S-23S spacer 核酸定序結果發現，除LWB-1 和LWB-3 外，其它spacer 中均具有1個tRNA<sup>le</sup>；這些植物菌質體16S-23S spacer 序列只有在tRNA<sup>le</sup> 及2段可能和rRNA processing 有關的區域較具保守性(圖三)，其他區域在不同群的植物菌質體之間的歧異度很大。

植物菌質體的G+C content 很低<sup>(19,34)</sup>，這表示在其演化過程中，核酸的變化以AT 取代GC 的情形較多，這種現象稱為AT pressure<sup>(26)</sup>。從本研究的植物菌質體16S-23S spacer 序列可推算出G+C content 介於24.3 mol% 與39.5 mol% 間，但值得注意的是位於tRNA 之區域的G+C content 則為51.9 mol%-55.8 mol%，表示在此區域的核酸變異較少，而非tRNA 的區域中，核酸變異較多。這樣的結果符合分子演化的neutral theory 的說法<sup>(15)</sup>，即在DNA 序列愈不具重要功能的區域，核酸的變異愈多。

以spacer 區域的核酸序列推衍出之原始演化樹為無根樹(unrooted tree)。根據Gundersen 等人<sup>(9)</sup> 以16S rDNA 序列推衍之結果，選擇最早分枝出去的AY 群(AYNJ、AYW 與SAY) 做為外群，其所得到的演化樹CI 值和g<sub>1</sub> 檢測<sup>(17)</sup> 均驗證植物菌質體16S-23S spacer 序列可提供良好的親緣關係資訊。

根據演化樹可將植物菌質體分為五群，第一群的SPWB、SPWBM、PNWB 及 IOWB 中，SPWB 和

SPWBM 同為感染甘藷的植物菌質體，而 IOWB 之寄主植物細花野牽牛與SPWB 之寄主植物甘藷同屬於 *Ipomoea*；第四群的RYD 之寄主水稻與SWL 寄主甘蔗均為單子葉植物，由此看來，植物菌質體或有和寄主植物有共同演化之現象。三種非本國之植物菌質體—EY、AYNJ 及AYW 都未與台灣或大陸之植物菌質體分在同一群中，或許暗示其演化和地理分布之相關性。上述推論之植物菌質體—寄主共同演化和地理分布對植物菌質體演化的影響須待更進一步之研究數據證實。

從本實驗室先前之DNA 探針與單元抗體研究，即知SPWB 和PNWB 的關係非常接近<sup>(18,36)</sup>；且根據Gundersen 等人<sup>(9)</sup> 之研究，SPWB 和PNWB 之16S rDNA 核酸序列幾乎完全相同，另外，本實驗室針對植物菌質體16S rDNA 限制片段長度多型性之研究，也發現SPWB 和PNWB 的限制酶圖譜完全相同<sup>(1)</sup>；本研究中，SPWB 和PNWB 的16S-23S spacer 序列也完全相同。根據以上之結果，在未來植物菌質體分類上，應可支持將SPWB 與PNWB 歸為同一「種」(species)。

而本實驗獲得的植物菌質體16S-23S spacer 核酸序列，除了可用於推斷植物菌質體演化上之關係外，尚可用於專一性引子之設計，利用PCR 技術應用於特定植物菌質體之偵測。

## 引用文獻

1. 徐仕美、林長平. 1998. 從16S rDNA 限制片段長度多型性分析台灣植物菌質體之親緣關係. 植病會刊 7:43-53.
2. Ahrens, U., and Seemuller, E. 1992. Detection of DNA of

- plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
3. Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148:107-127.
  4. Chen, M. F., and Lin, C. P. 1997. DNA probes and PCR primers for the detection of a phytoplasma associated with peanut witches'-broom. *Europ. J. Plant Pathol.* 103:137-145.
  5. Doi, Y., Teranaka, M. Yora, K., and Hidefumi, A. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 33:259-266.
  6. Doyle, J. J., Doyle, J. L., and Hortorium, L. H. B. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
  7. Duncan, A. J., Carman, R. J., Olsen, G. J., and Wilson, K. H. 1993. Assignment of the agent of Tyzzer's disease to *Clostridium piliforme* comb. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:314-318.
  8. Green, C. J., Stewart, G. C., Hollis, M. A., Vold, B. S., and Bott, K. F. 1985. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* ribosomal RNA operon, *rrnB*. *Gene* 337:261-266.
  9. Gundersen, D. E., Lee, I. -M., Rehner, S. A., Davis, R. E., and Kingsbury, D. T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organism (phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 176:5244-5254.
  10. Higgins, D. G., and Sharp, P. M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.
  11. Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C. R., Meng, B. Y., Li, Y. Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K., and Sugiura, M. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217:185-194.
  12. Innis, M. A. Myambo, K. B., Gelfand, D. H., and Brow, M. A. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:9426-9440.
  13. Iwami, M., Muto, A., Yamao, F., and Osawa, S. 1984. Organization of ribosomal RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. *Mol. Gen. Genet.* 196:311-316.
  14. Jensen, M. A., Webster, J. A., and Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
  15. Kimura, M. 1983. Rare variation alleles in the light of the neutral theory. *Mol. Biol. Evol.* 1:84-93.
  16. Kirkpatrick, B. C., Stenger, D. C., Morris, T. J., and Purcell A. H. 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238:197-200.
  17. Klassen, G. J., Mooi, R. D., and Locke, A. 1991. Consistency indices and random data. *Syst. Zool.* 40:446-457.
  18. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches'-broom. *Phytopathology* 84:468-473.
  19. Kollar, A., and Seemuller, E. 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant disease. *J. Phytopathol.* 127:177-186.
  20. Kuske, C. R., and Kirkpatrick, B. C. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:226-233.
  21. Lee, I.-M., Davis, R. E., Sinclair, W. A., DeWitt, N. D., and Conti, M. 1993. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology* 83:829-833.
  22. Lim, P.-O., and Sears, B. B. 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171:5901-5906.
  23. Lin, C. P. and Chen, T. A. 1985. Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. *Science* 227:1233-1235.
  24. Lin, C. P., Shen, W. C., Ko, H. C., Chang, F. L., Yu, Y. L., Chen, M. F., and Wu, F. Y. 1993. Application of monoclonal antibodies and cloned DNA probes for the detection and differentiation of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Plant Pathol. Bull.* 2:161-168.
  25. McCoy, R. E., Caudwell, A., Chan, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., de Leeuw, G. T. N., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M., and Seemuller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pages 545-640 in: *The Mycoplasmas*. Vol. 5. Spiroplasmas, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of Plants and Arthropods. R. F. Whitcomb, and J. G. Tully, eds. Academic Press, New York.
  26. Muto, A., and Osawa, S. 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:166-169.
  27. Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., and Tsuchizaki, T. 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:461-467.



28. Navas-Castillo, J., Laigret, F., and Bove, J.-M. 1993. 16S rDNA sequence analysis of *Acholeplasma seiffertii*, a mollicutes from plant surfaces, and its transfer to *Mesoplasma*, a new genus in the spiroplasma phylogenetic group. *Nucleic Acids Res.* 21:2249.
29. Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., and Pace, N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:337-365.
30. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
31. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
32. Sawadam, H., Ieki, H., Oyaizu, H., and Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:694-702.
33. Schneider, B., and Seemuller, E. 1994. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic Mollicutes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3409-3412.
34. Sears, B. B., Lim, P.-O., Holland, N., Kirkpatrick, B. C., and Klomparens, K. L. 1989. Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:175-180.
35. Seemuller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K. H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B. B., and Stackebrandt, E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:440-446.
36. Shen, W. C., and Lin, C. P. 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches' broom. *Phytopathology* 83:671-675.
37. Swofford, D. L. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.0s. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
38. Tohdoh, N., Shinozaki, K., and Sugiura, M. 1982. The complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from tobacco chloroplast. *Gene* 17:213-218.
39. von Allmen, J. M., and Stutz, E. 1988. The soybean chloroplast genome: nucleotide sequence of a region containing tRNA-Val (GAC) and 16S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* 16:1200.

## ABSTRACT

Hsyu, S. M.<sup>1</sup> and Lin, C. P.<sup>1,2</sup> 2002. Phylogenetic relationships of phytoplasmas on the basis of sequences of 16S-23S rDNA spacers. *Plant Pathol. Bull.* 11:199-206. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: cplin@ccms.ntu.edu.tw, Fax: +886-2-23661980)

The phylogenetic relationships and classification of 10 phytoplasmas were established by analysis of 16S-23S rDNA spacers, the regions with variation in prokaryotic *rrn* operon. The spacer regions were amplified by polymerase chain reaction using two primer pairs, G1/L1 and fH3/rH3. One spacer fragment was amplified for each phytoplasma, except loofah witches' broom (LWB) phytoplasma. There were three amplified spacer fragments for LWB phytoplasma. These amplified DNA were sequenced, and the results showed that the phytoplasma 16S-23S spacer region contains a single tRNA<sup>Ile</sup>; however, there is no tRNA in two spacers of LWB phytoplasma, LWB-1 and LWB-3. In multiple alignment of phytoplasma spacers, only tRNA<sup>Ile</sup> and two short segments, which may be involved in rRNA processing, appeared to be conserved. Based on phylogenetic analysis of sequences from these 10 phytoplasmas using PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) software, these phytoplasmas could be classified into five groups. These phytoplasmas groups and strains were: group 1, sweetpotato witches' broom, mainland China strain of sweetpotato witches' broom, peanut witches' broom and *Ipomoea obscura* witches' broom; group 2, loofah witches' broom; group 3, elm yellows; group 4, rice yellow dwarf and sugarcane white leaf disease; group 5, New Jersey strain of aster yellows and western strain of aster yellows.

Key words: phylogenetic relationships, phytoplasma.